

## オオムギうどんこ病菌における 有性生殖初期段階の観察

部 田 英 雄

先に日浦ら<sup>9)</sup>は、日本各地から採集したオオムギうどんこ病菌 (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) のうち、それぞれ病原性の異なる 15 の菌株を純粋培養し、これらを相互に組合わせて交配実験を行った。その結果、これらの菌株は 2 つの交配型に群別され、子のう殻の形成は互いに相対する交配型が組合わさったときにだけ認められたことから、本菌は heterothallic であることが明らかになった。またこれら 2 つの交配型に関する遺伝子は 1 つであり、交配型遺伝子と病原性遺伝子間には連鎖が認められないことが明らかになった。高松ら<sup>9,10)</sup> は各種うどんこ病菌の子のう殻の表面構造および子のう殻形成過程を走査電子顕微鏡で、Björling<sup>11)</sup> および Gordon<sup>8)</sup> も数種のうどんこ病菌の子のう殻形成過程を光学顕微鏡で観察している。しかし、これまでにうどんこ病菌の子のう殻形成過程について、交配型の明らかな菌株を用い、一定の条件下で交配を行い経時的に観察したものは少ない。

本報告はオオムギうどんこ病菌の有性生活環に基づき、交配型を決定した菌株を用いて菌糸体の生育型、菌糸体の動行、配偶子のうの初期形成過程、剛毛状菌糸の形成および子のう殻壁の形成など有性生殖の初期段階について光学顕微鏡および走査電子顕微鏡で観察した結果の 1 部をとりまとめたものである。

本研究を行うにあたり種々御教示いただいた日浦運治岡山大学名誉教授、恒温器および光測定に御教示と便宜を賜った当研究所木村和義教授並びに走査電子顕微鏡の使用に際し御便宜を賜った兼久勝夫教授並びに河田和雄助教授に謝意を表する。

### 観察材料および方法

宿主の育成 直径 3 cm、高さ 5 cm のブリキ製の植木鉢に、オオムギ品種、黒麦 148 号の種子を 3 粒ずつ播種した。他のうどんこ病菌からの汚染を防ぐために植木鉢を木箱内に入れ、2 面 (22×34 cm) にガラス、他の 2 面と上部に白いサラシを張った隔離育苗枠 (22×21×34 cm) をかぶせ、15—25°C の温室内で 10—14 日間、第 2 葉が現われる頃まで育苗した。

昭和 61 年 1 月 8 日受理

本研究の 1 部は、文部省科学研究費補助金、課題番号 466022 によって行われた。また本報告の内容の一部は、昭和 53 年 4 月 4 日、昭和 55 年 10 月 31 日、日植病学会、昭和 55 年 5 月 24 日 日本菌学会で発表した。

**オオムギうどんこ病菌** オオムギうどんこ病菌 (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) は菌株  $H_1$ ,  $h_2$ ,  $h_9$  および  $H_{14}$  ( $H_1$  と  $h_2$ ,  $h_9$  と  $H_{14}$ ,  $H_1$  と  $h_9$  および  $h_2$  と  $H_{14}$  はそれぞれ互いに相対する交配型の菌株である) を用いた。それぞれの菌株は試験管内で育苗したオオムギ品種、黒麦 148 号に接種して増殖させたものを供試した。

**菌の交配** オオムギ品種、黒麦 148 号の第 1 葉の任意な 1—2 個所にマジックペンで目印を付け、その印の近くに  $H_1$  あるいは  $h_2$  の分生胞子を小筆の先で極く少量一次接種し、それを直ちに  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 (RH) 63—70% の恒温器内 ( $40 \times 50 \times 60$  cm) に保った。なお、恒温器の内部は、自然昼白色蛍光灯 (National realux lamp, FL 20 EDL 50) を 6 本使用した。白色光の全エネルギーは約  $10,000 \text{ erg/cm}^2/\text{sec.}$  で人工照明した。 $H_1$  あるいは  $h_2$  を一次接種後、それぞれ所定の時間が経過した生長菌そう上に、 $h_2$  あるいは  $H_1$  の分生胞子を小筆の先でふりかけ (二次接種) た後、再び恒温器内に保った。また  $h_9$  と  $H_{14}$  菌株についても、 $H_1$  と  $h_2$  の交配実験と同様の方法で行い、菌株の違いによる各器官形成の差異について調査した。

**光学顕微鏡観察** (以下光顕観察と略す) 光顕観察は、二次接種後 12, 24, 36, 48, 72, 84 および 96 時間目の試料について行った。オオムギ葉の接種部位を長さ約 5 mm に切り取り、直ちに固定液 (70% アルコール、ホルマリン、氷酢酸の等量混合液) に浸漬し、7 日間以上、固定および脱色を行った後、常法に従い、1N HCl で  $20^{\circ}\text{C}$ 、5 分間、ついで  $60^{\circ}\text{C}$ 、10 分間加水分解した。2—3 回水洗した試料を 4% 鉄みょうばん水で 30 分間媒染した後、流水で洗浄し、酢酸カーミン液で 10 分間以上核染色を行った。また、過染試料は 45% 酢酸液で染色度を調節した。染色した試料は 20% グリセリンで封埋し検鏡した。本方法によって染色されたものが細胞核であることを確認するため、1 部の試料についてはホイルゲンの核染色を行った。

**走査電子顕微鏡観察** (以下走査電顕観察と略す) 走査電顕用試料台 (アルミニウム製、直径 10 mm、高さ 10 mm) の一方の面に貼付した両面粘着テープ上に約 5 mm に切り取った無処理の葉片を固着させ、走査電顕 (JSM-50A 型、日本電子株式会社製) で観察した。観察には試料をできるだけ生体時の状態で像観察および写真撮影を行うため、Day & Scott<sup>2)</sup> および徳永ら<sup>11)</sup> の方法にはほぼ準じ、無処理のまま、3KV の低加速電圧下、5,000 倍以下で 10 分以内に観察および写真撮影を完了した。

## 観察結果および考察

### 1. 発芽管同士あるいは菌糸同士の融合

オオムギうどんこ病菌では、二次接種後、異常発芽管と菌糸、異常発芽管同士あるいは菌糸同士間において融合が起ることが報告されている<sup>8)</sup>。また、オオムギうどんこ病菌 race 9 の菌そう上に race 1 の分生胞子を二次接種した場合、接種後 20 時間で菌糸と発芽管との融合が起り、融合した細胞間だけで核の移行が認められたことが報告されている<sup>8)</sup>。

本実験では、一次接種後 48 時間経過した  $H_1$  の菌そう上に  $h_2$  の分生胞子をふりかけてから 12, 24, 36 および 48 時間後に両菌株間における融合状況を観察した。その結果、12 時間後、すでに  $H_1$  の菌糸に隣接した  $h_2$  の発芽管が伸長し  $H_1$  菌糸と接触あるいは融合しているようであった (Plate I-2)。24 時間後には、このような接触の場面がさらに多く認

められた。48時間後には、伸長した菌糸同士の接触も観察された (Plate I-3)。また発芽管同士の接触も観察された (Plate I-1)。このようにそれぞれの器管の接触は、菌株の交配型には関係なく起り、単一菌株の間でも観察された。接触面においては、明らかな融合管は認められなかった。接触している両方の細胞核は、それぞれ単核であり、核の移行は認められなかった。

## 2. 配偶子のうの初期形成過程

(1) 単一菌株  $H_1$ ,  $h_2$ ,  $h_9$  および  $H_{14}$  のそれぞれ単一菌株の接種では、供試されたいずれの菌株においても配偶子のうおよび剛毛状の菌糸の形成 (後述) など有性生殖に関する様相は全く認められなかった。

(2) 同じ交配型菌株の組合せ  $H_1$  あるいは  $h_2$  を一次接種してから48時間後の菌そう上に同じ交配型の菌株  $H_{14}$  あるいは  $h_9$  の分生胞子をそれぞれふりかけ、24, 48, 72 および 96 時間後に配偶子のうの形成について観察した。その結果、配偶子のうおよび剛毛状の菌糸の形成など有性生殖に関する様相は全く認められなかった。

(3) 互いに相対する交配型菌株の組合せ 一次接種後48時間経過した  $H_1$  菌そう上に互いに相対する交配型菌株  $h_2$  の分生胞子をふりかけた後、12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 および 96 時間目に配偶子のうの初期形成過程について観察した。その結果、36 時間経過後までは配偶子のうの形成は認められなかったが、48時間後には、2本の菌糸が平行して接近あるいは交叉した位置に小突起状の細胞が2つ並んで形成されているのが観察された。これら2つの小突起状の細胞は、次第に生長し、雌雄配偶子のう (造のう器、造精器に発達するもの) に発達した。これらの観察結果から、配偶子のうの初期形成の開始時間について、さらに詳細な調査を行うため、交配型菌株  $h_2$  の分生胞子をふりかけ (二次接種) た後、36時間から48時間目まで、3時間おきに5回調査した。その結果、39時間後に二次接種した  $h_2$  の菌糸が一次接種  $H_1$  の菌糸と並行に接近あるいは交叉した位置に、plate II-1 に示すように、小突起状の細胞が形成された。この小突起状の細胞は生長して隔膜を形成し、 $h_2$  の菌糸細胞から区別された。この細胞は、48—60時間後頃になると、1回の細胞分裂を行って2つの細胞になった。下位の細胞は柄細胞、上位の細胞が雌配偶子のうである。次に、二次接種した  $h_2$  菌糸に初期形成が認められてから3—6時間後、先に形成された  $h_2$  の小突起状の細胞に極めて接近した位置の一次接種  $H_1$  の菌糸上に小突起状の細胞が並んで形成された (Plate II-2, 3, 4)。その小突起状の細胞も生長し、隔膜によって  $H_1$  の菌糸細胞と区別され、一つの細胞になった。さらに生長して1回の細胞分裂によって2つの細胞になった。 $H_1$  の菌糸に近い下位の細胞が柄細胞で、上位の細胞が雄配偶子のうである。普通雌配偶子のうは雄配偶子のうより始めから大きい (Plate II-5, 6, III-1, 2, 3)。二次接種後72—84時間 (雌配偶子のう形成後24—36時間) 頃、成熟した雄配偶子のうは、その先端を雌配偶子のうの側面あるいは上部面に接させてその部位が融合する (Plate I-4, 5)。融合後雌配偶子のうから核の移行が起り、雌配偶子のう (核の移行後は造のう器) 内には2つの核が認められた (Plate I-4, 5)。雌雄の核の大きさはほぼ同じ位であった。また、二次接種後48—60時間 (雌配偶子のう形成後10—20時間) 頃、雄配偶子のうと接する雌配偶子のうの反対側面の方向へ、雄配偶子のうの柄細胞の上端にもう1つの細胞が形成された。この細胞 (後に子のう殻壁細胞に発達する) は、後に雄配偶

子のうのように雌配偶子のうの側面に沿って生長した (Plate I-4, 5, III-3).

上記の実験では、 $H_1$  を一次接種菌、 $h_2$  を二次接種菌としたが、菌株の接種順序と雌雄配偶子のうの形成との関係を明らかにするために、菌株の接種順序を変えて実験した。

一次接種した  $h_2$  の菌そう上に  $H_1$  の分生胞子をふりかけたのち、36時間日から48時間後まで3時間おきに5回、雌雄配偶子のうの初期形成について調査した。その結果、上記の場合と同様に、39時間後に二次接種した  $H_1$  の菌系上に先に小突起状の細胞が形成された。その後、3—6時間目に一次接種  $h_2$  の菌系上に、先に形成された小突起状の細胞に接近した部位に同様の細胞が形成された。このように、菌株には関係なく、常にふりかけた菌系上に先に小突起状の細胞 (雌配偶子のうに発達するもの) が形成されたことから、雌雄の配偶子のうはいずれの菌株でも形成されることが明らかになった。また  $h_9$  と  $H_{14}$  についても同様の実験を行ったところ全く同じ結果を得た。

(4) 二次接種時期と配偶子のう初期形成との関係 一次接種した  $H_1$  の菌そう上に0, 24, 48, 72 および96時間後  $h_2$  の分生胞子をふりかけ、その後24, 48, 72 および96時間目に雌雄配偶子のうの形成を観察した。その結果、配偶子のうは、一次接種してから48 および72時間後にふりかけた区が最も早く形成され、0 および96時間目にふりかけた区では遅かった。

### 3. 菌糸体の生育型

Homma<sup>2)</sup> は、タンポポうどんこ病菌 (*Sphaerotheca fuliginea*) は homothallic であり、その造のう器および造精器は、それぞれ造のう菌糸および造精菌糸上に同時に形成され、造精菌糸は造のう菌糸より細いことを報告している。そこで、*E. graminis* f. sp. *hordei* においても、造のう菌糸および造精菌糸が存在し、菌糸の太さに差異が認められるか否かについて観察したが、本菌においては、Homma が述べているような造のう菌糸および造精菌糸の存在は明らかではなかった。しかし、本研究においては、*E. graminis* f. sp. *hordei* の菌糸体には2つの生育型が観察された。一つは単一菌株を接種した場合にみられる生育型で、吸器、分生子梗および分生胞子を形成し、雌雄配偶子のうを形成しない無性生活環の菌糸 (Plate IV-1, 3) である。他の一つは、互いに相対する交配型の菌株を混合培養した場合にみられるもので、両菌株の菌糸が接触あるいは融合することによって両菌の混合培養後新たに形成される菌糸で、単一菌株を培養した場合にはみられない菌糸で、その直径は細く、分枝数が増加するとともに斜行、蛇行しながら伸長し、また菌糸の先端が湾曲するものが観察された (Plate IV-2)。このような菌糸には、吸器、分生子梗および分生胞子が殆んど形成されなかった (Plate IV-4)。しかし、この菌糸に雌雄配偶子のうおよび剛毛状の菌糸 (後述) が形成された。このことから、この菌糸は、有性生殖器官を形成する有性生活環の菌糸である。今後この菌糸を仮に配偶子のう菌糸と呼ぶことにする。

### 4. 子のう殻壁の初期形成

Homma<sup>2)</sup> によれば、*Sphaerotheca fuliginea* の一次子のう殻壁を形成する細胞は、造のう器の柄細胞から分化し、ねじれた菌糸細胞から形成されると報告している。

筆者の観察では、雌配偶子のうが2核になった頃、雄配偶子のう形成に並んで柄細胞に数個の新たな細胞が発生し、これらが菌糸状に生長しながら雌配偶子のうを囲み、雌配偶

子のうの上部でこれらの細胞が接触して融合が行われ、これら細胞融合体がのちに子のう殻壁に発達するものである (I-6, 7, III-4, 5, 6)。

#### 4. 剛毛状菌糸の形成過程

日浦<sup>5)</sup>は、*E. graminis* DC. の異なった交配型の菌株を交配すると、交配後7—10日目に単一菌株を接種した場合には認められない白色緻密な菌そうが発達することを肉眼で観察した。この白色緻密な菌そうの形成には互いに相対する交配型の菌糸が出合う必要があり、両菌糸の接触後、細胞質融合によって生じた菌糸であると報告している。また著者ら<sup>4)</sup>は、光顕観察の結果、白色緻密な菌そうは、剛毛状の菌糸の集まりであり、互いに相対する交配型の菌株を交配したものだけに生じ、交配後2—3日目に配偶子のうとともに認められることを報告した。

そこで、剛毛状菌糸の形成過程の観察をさらに詳細に行うため、雌雄配偶子のうの初期形成の観察と並行して行った。その結果、二次接種後42時間頃から未熟な菌糸が認められ (Plate IV-2)、48時間目には明らかに剛毛状の菌糸であることが確認された (Plate IV-5)。その初期形成の場所は配偶子のうが形成されている近くの菌糸であり、また菌糸からほぼ直角に気中菌糸の状態で伸長することが認められた (Plate IV-5)。この菌糸の形成量は、配偶子のうの発達とともに増加した。成熟した剛毛状の菌糸は通常2細胞である。しかし3細胞あるいはまれに4細胞の菌糸もみられた。細胞の核数は1個である。菌糸細胞の直径は約4.6—4.8  $\mu\text{m}$ 、長さは約250—380  $\mu\text{m}$ であった (Plate IV-6)。この剛毛状の菌糸は分枝せず、吸器、分生子梗、分生孢子および雌雄配偶子のうを形成しなかった。

#### 摘 要

本研究は、オオムギうどんこ病菌における有性生殖の初期段階について光顕および走査電顕を用いて観察したものである。

1) 単一菌株の接種あるいは同じ交配型菌株の混合培養では、雌雄配偶子のうの形成はなく、有性生殖の様相は認められなかった。

2) 雌雄配偶子のうの初期形成時間は、互いに相対する交配型菌株を交配すると、二次接種後39時間目に小突起状の細胞 (後に雌配偶子のうに発達するもの) が形成された。そして3—6時間後、もう一つの細胞 (後に雄配偶子のうに発達するもの) が、先に形成した細胞に接近して形成された。

3) 二次接種後約72—84時間頃、雄配偶子のうの先端が雌配偶子のうの側面あるいは上部面と融合した。融合後雄配偶子のうの核が雌配偶子のうの中へ移行した。

4) 雌雄配偶子のうの初期形成順位は、互いに相対する交配型菌株の接種順序を変えて観察した結果、菌株には関係なく、常に二次接種した菌糸上に先に雌配偶子のうが形成された。

5) *E. graminis* f. sp. *hordei*. の菌糸には2つの生育型が観察された。一つは単一菌株を接種した場合にみられるもので、吸器、分生子梗および分生孢子を形成し、雌雄配偶子のうを形成しない無性生活環の菌糸である。他の一つは、互いに相対する交配型菌株の混合培養後に発生する菌糸である。それらの菌糸の交叉する部位にそれぞれ小突起状の細

胞が並んで形成された。これらの細胞は生長して隔膜によってそれぞれ2つの細胞になる。下位の細胞が各柄細胞で、上部の細胞が一方は雌配偶子のう、他方は雄配偶子のうである。その柄細胞に接近した菌糸上に剛毛状の菌糸が形成された。これが有性生活環の菌糸である。今後この菌糸を仮に配偶子のう菌糸と呼ぶことにする。

6) 前記の雄配偶子のう形成に並んで柄細胞に数個の新たな細胞が発生し、これらが菌糸状に生長しながら雌配偶子のうを囲み、雌配偶子のうの上部でこれらの細胞が接触して融合が行われ、これら細胞融合体がのちに子のう殻壁に発達するものである。

7) 剛毛状菌糸の初期形成は、配偶子のうの初期形成時期と殆んど同じ頃であった。形成量は雌雄配偶子のうの発達にともない増加した。

## 文 献

1. Björling, K. 1946. Observations on the development of *Erysiphe graminis* DC. Kungl. Fysiogr. Sällsk. I Lund. Förh. 16: 187-204.
2. Day, P. R. and Scott, K. J. 1973. Scanning electron microscopy of fresh material of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Physiol. Plant Path. 3: 433-435.
3. Gordon, C. C. 1966. A reinterpretation of the ontogeny of the ascocarp of species of the Erysiphaceae. Amer. J. Bot. 53: 652-662.
4. 部田英雄, 日浦運治. 1976. *Erysiphe graminis* DC. の formae speciales 間における生殖的隔離. 日植病報. 42: 335.
5. 日浦運治. 1965. *Erysiphe graminis* DC. の formae speciales 間の和合性および formae speciales 間交雑により形成された子のう胞子の寄生力. 農学研究 51: 67-74.
6. 日浦運治, 部田英雄, 津島孝宏. 1961. オオムギウドンコ病菌の Heterothallism. 病原性の変異に関する研究 I. 農学研究 48: 49-54.
7. Homma, Y. 1937. Erysiphaceae of Japan. J. Facul. Agric. Hokkaido Imp. Univ. Sapporo 38: 183-461.
8. 内藤秀樹, 平田幸治. 1969. 大麦白渋病菌の菌糸と分生胞子の発芽管との融合について. 新潟農林研究 21: 29-36.
9. 高松 進, 石崎 寛, 久能 均. 1979. 各種うどんこ病菌子のう殻の走査電顕観察 (第2報). *Uncinula*, *Microsphaera* 属菌. 三重大学農学部学術報告 59: 33-42.
10. Takamatsu, S., Ishizaki, H. and Kunoh, H. 1982. Scanning electron microscopy on perithecia of powdery mildew fungi III. Perithecial development in mulberry powdery mildew, *Phyllactinia moricola*. Trans. Mycol. Soc. Japan 23: 279-286.
11. 徳永純一, 幡場良明. 1971. 生物試料の調製と二次電子像の形態学的分析の問題点. 細胞 3 (13): 17-31.

**Observations on initial stage of sexual reproduction in  
the barley powdery mildew fungi (*Erysiphe*  
*graminis* DC. f. sp. *hordei* Em. Marchal)**

Hideo HETA

**Summary**

The initial developmental stage of sexual reproduction in *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* was examined using light and scanning electron microscopes.

When the hypha fused within the same strain with a strain having the same mating type, neither female and male gametangium were formed. A projection-cell (original female gametangium) was formed on the reinoculated hypha fused between the different sexual strains or different mating type strains 39 hours after reinoculation, and then 3 to 6 hours later, a similar projection-cell was formed on the hypha which closely approached the hypha primary inoculated. The tip cell of the male gametangium fused with female gametangium of the top or side 72 to 84 hours after reinoculation. After the fusion, a nuclei in the male gametangium was translated in the cell of the female gametangium.

The results of cross inoculation between different mating type strains showed clearly that after inoculation the female gametangium was always formed on the secondary inoculated hypha before the male gametangium.

The mycelium of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* had two growth types, one was that of the hypha of the asexual cycle from a single strain, and the other was the hypha of the sexual cycle fused between different mating type strains, the latter hypha was tentatively designated as "gametangial hypha".

The new cell developed on the stalk cell of male gametangium grew and enclosed the female gametangium. The apical cells fused at the upper part of the female gametangium, and became perithecial wall cells.

Initial seta-like hyphae were formed at almost the same time as the female and male gametangia.



### Explanation of plates

Legend: AN=antheridium; AS=ascogonium; CF=cell fusion; N=nucleus  
FG=female gametangium; MG=male gametangium; SH=seta-like hypha  
PW=initial perithecial wall cell; PC=projection-like cell

#### Plate I.

Light micrographs of germ tube fusion and perithecial wall cell.

1. Fusion between germ tubes.
2. Fusion between germ tube and hypha.
3. Fusion between hypha.
- 4, 5. Female and male gametangium fusion, Two nucleus in the ascogonium.
- 6, 7. Initial perithecial wall cell.

Bar represents 1-4, 6, 7=10  $\mu m$ , 5=20  $\mu m$ .

#### Plate II.

Scanning electron micrographs of projection-like cells and the female and male gametangium.

- 1-4. Initial projection-like cells which was formed on contact or crossing sexual hypha. Time after reinoculation: 1=43 hours, 2, 3=45 hours, 4=48 hours.

- 5, 6. Development process of female and gametangium for projection-like cells. Time after reinoculation: 5=48 hours, 6=60 hours.

Bar represents 1-6=5  $\mu m$ .

#### Plate III.

Scanning electron micrographs of female and male gametangium and perithecial wall cells.

- 1-3. Various growth process of female and male gametangium. Time after reinoculation: 1, 2=60 hours, 3=72 hours.

- 4, 5. Ascogonium, Initial stage of perithecial wall cells.

6. Initial perithecial wall cells 96 hour after reinoculation.

Bar represents 1-6=5  $\mu m$ .

#### Plate IV.

Light micrographs (1-4, 6) and scanning electron micrograph (5) of the mycelium for a single strain and gametangium hypha.

- 1, 3. Growth mycelium for a single strain.

2. Mycelium 48 hours after reinoculated conidia of different mating type strain.

4. Gametangium hypha 96 hours after reinoculation.

5. Initial seta-like hypha 43 hours after reinoculation.

6. Seta-like hypha 96 hours after reinoculation.

Bar represents 1-4=25  $\mu m$ , 5=10  $\mu m$ , 6=50  $\mu m$ .



Plate I.

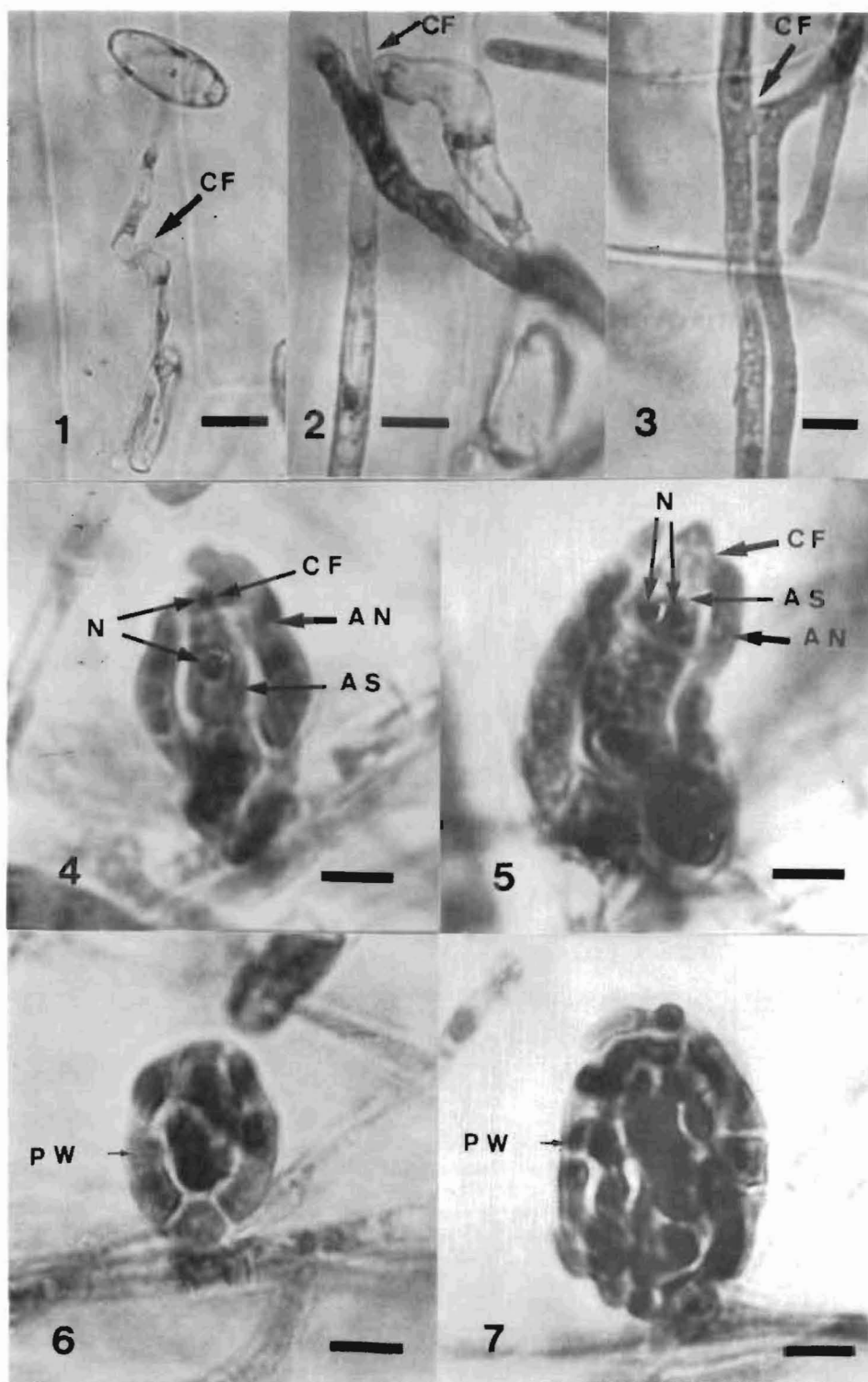


Plate II.

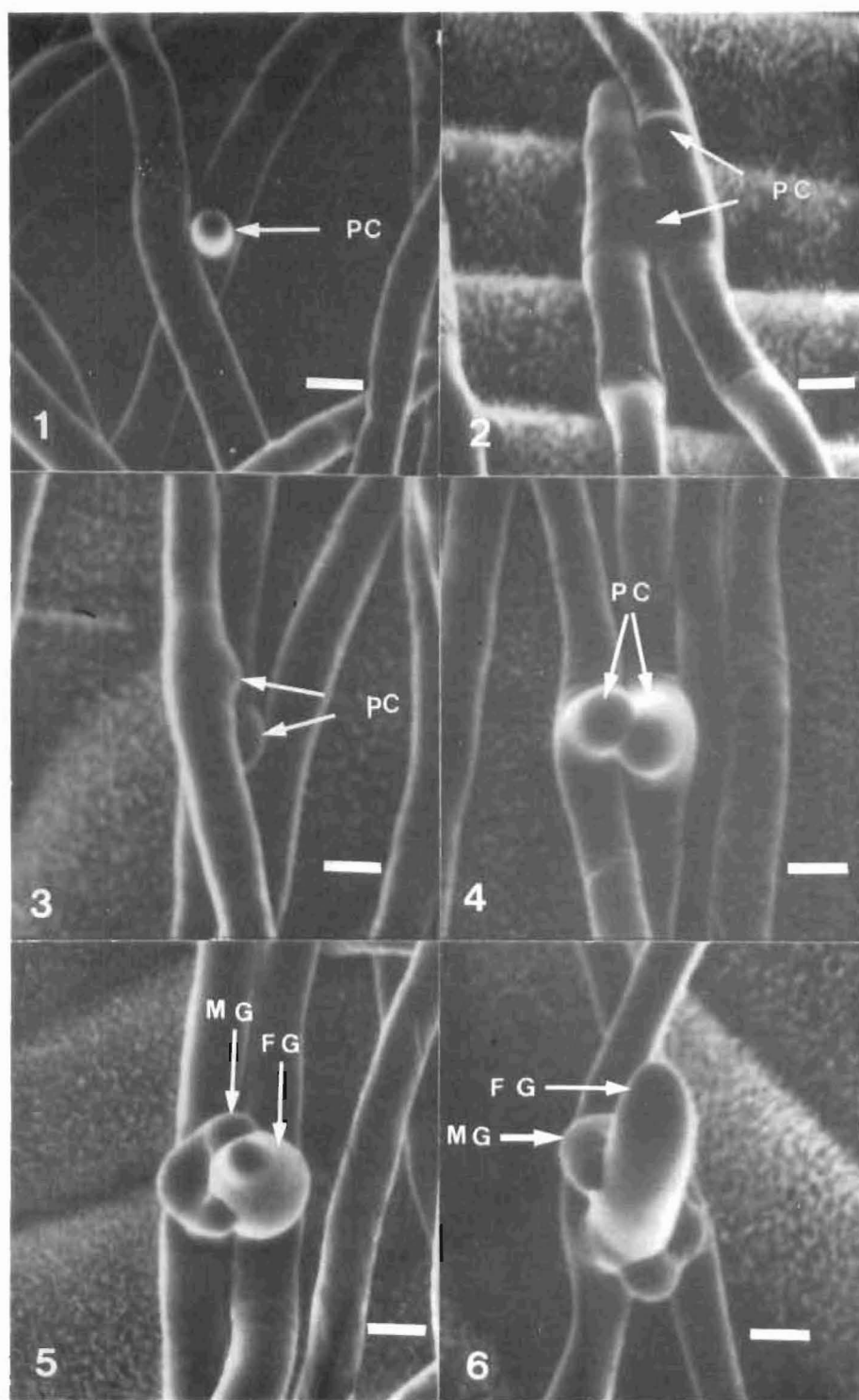


Plate III.

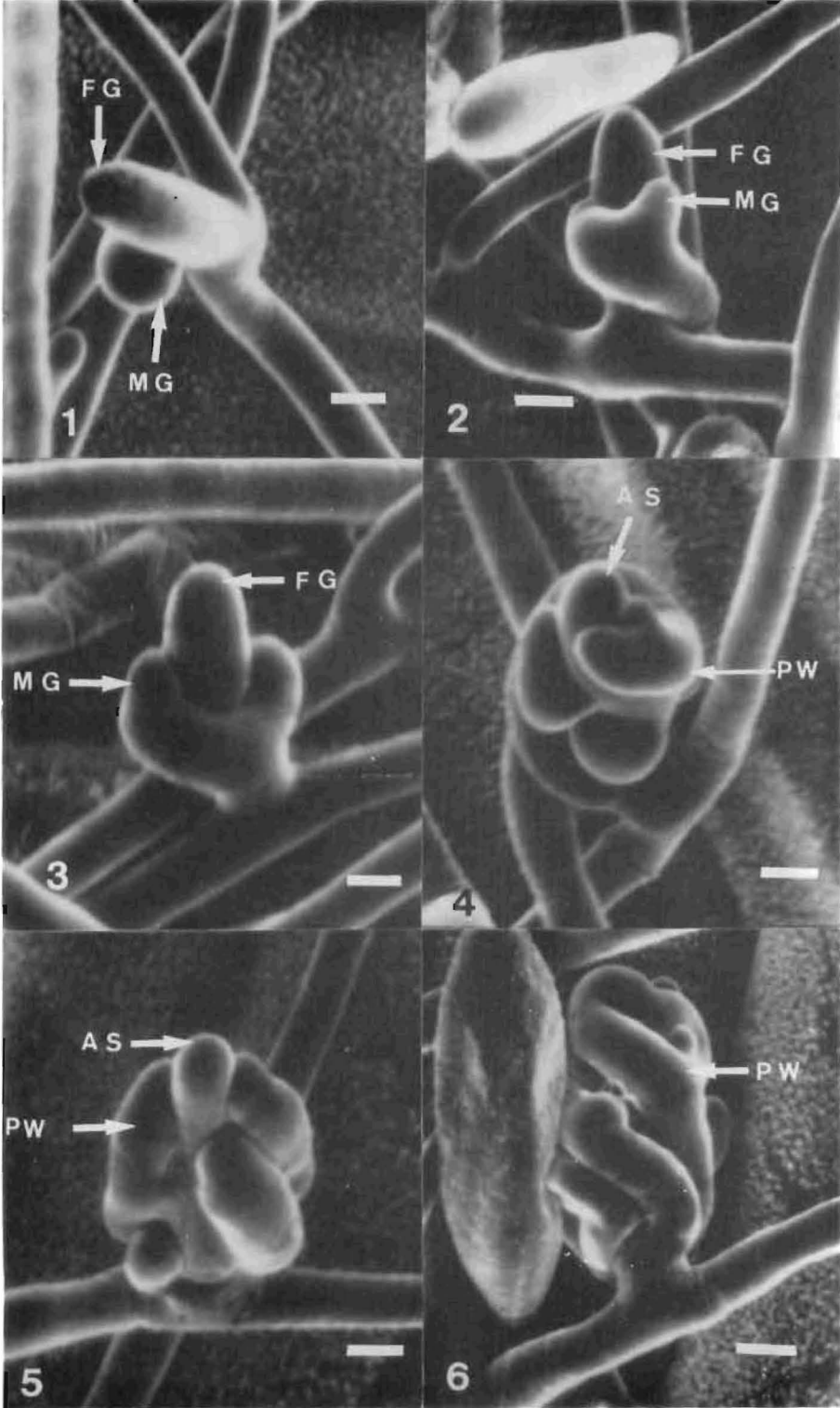


Plate IV.

